

550951

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年10月14日 (14.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/087764 A1

(51) 国際特許分類: C07K 16/44, C12N 15/13, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577

(74) 代理人: 河宮治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル青山特許事務所 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004355

(22) 国際出願日: 2004年3月26日 (26.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-091663 2003年3月28日 (28.03.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 京都電子工業株式会社 (KYOTO ELECTRONICS MANUFACTURING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6018317 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68 Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 澤田石一之 (SAWADAISHI, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒6018317 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68 京都電子工業株式会社内 Kyoto (JP). 日向野桂一 (HIGANO, Keiichi) [JP/JP]; 〒6018317 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68 京都電子工業株式会社内 Kyoto (JP). 片岡千和 (KATAOKA, Chiwa) [JP/JP]; 〒6018317 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68 京都電子工業株式会社内 Kyoto (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: RECOMBINANT ANTIBODY RECOGNIZING DIOXIN AND GENE ENCODING THE ANTIBODY

A1

(54) 発明の名称: ダイオキシンを認識する組換抗体および該抗体をコードする遺伝子

WO 2004/087764

(57) Abstract: A novel recombinant antibody having an activity of binding to 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF); a gene encoding the amino acid sequence thereof; a vector carrying the gene transferred thereinto; a transformant transformed by the vector; a process for producing the recombinant antibody; a method of immunologically capturing 2,3,4,7,8-PeCDF by using the recombinant antibody; and an assay method. Use of the recombinant antibody as described above makes it possible to quickly, conveniently and highly sensitively capture and assay dioxins, in particular, 2,3,4,7,8-PeCDF by an immunological technique.

(57) 要約: 本発明は、2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン(2,3,4,7,8-PeCDF)に結合活性を有する新規な組換抗体、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子、該遺伝子を導入したベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、該組換抗体の製造方法、該組換抗体を用いる2,3,4,7,8-PeCDFの免疫学的捕獲法ならびに測定法に関する。本発明の組換抗体を用いて、ダイオキシン類、特に2,3,4,7,8-PeCDFを、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定することができる。

明細書

ダイオキシンを認識する組換抗体および該抗体をコードする遺伝子

5 技術分野

本発明は、2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン(2, 3, 4, 7, 8-PeCDF)に結合活性を有する新規な組換抗体、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子、該遺伝子を導入したベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、該組換抗体の製造方法、該組換抗体を用いる2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの免疫学的捕獲法ならびに測定法に関する。

10 背景技術

内分泌搅乱物質による環境汚染が問題となり、その汚染状況の把握やヒトの健康への影響などの調査が進められている。これら内分泌搅乱物質によるヒトや環境への影響が明らかになるに従い、日本のみならず世界各国においても重大な社会的関心事となっている。なかでもダイオキシン類については、ヒトや生態系および環境への持続的な影響が懸念されおり、汚染状況の把握や、ヒトや生態系での暴露状況の調査、摂取ルートの解明、さらには汚染箇所のダイオキシン量のモニタリングや汚染除去方法への対応が急務となっている。ダイオキシン類は、有機塩素化合物の使用、生産、燃焼などの過程で生成することから発生源が多岐に渡るとともに、土壤、水質、大気、食品、海産物などにおいて広範な汚染が確認されている。従って、膨大な生体試料や環境試料などの試料中のダイオキシン濃度を測定し、対策を講じる必要から、ダイオキシン類の簡便かつ迅速な測定方法の確立が望まれている。

25 ダイオキシン類には、75種類のポリクロロジベンゾダイオキシン(PCDD)および135種類のポリクロロジベンゾフラン(PCDF)からなる多数の構造異性体が存在する。最も毒性が高い2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン(2, 3, 7, 8-TCDD)の毒性を1としたときの各ダイオキシン異性体の相対毒性が毒性等価指数として示されており、ダイオキシン類の分析においては

毒性の高い7種類のPCDDおよび10種類のPCDFが測定対象物質とされている。また、内分泌搅乱物質の1つとして以前から問題とされていたポリクロロビフェニール(PCB)のうち12種類の共平面(co-planar)PCBもダイオキシン類として測定されるようになった。

5 ダイオキシン類の測定は、従来、高分解能ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(HRGC/HRMS)分析により行われていた。しかし、HRGC/HRMS法は、試料中の妨害物質を除去するために多段階のクリーンアップ操作を必要とし、分析機器が高額であり、かつ測定者の習熟を要するため、特定の分析機関においてのみ測定が可能であった。ダイオキシン類の分析方法、特にHRGC/HRMS法においては、毒性の高い17種類のダイオキシン異性体の含有量を個々に定量し、次いで各異性体の実測値に毒性等価指数を乗じた値の総和を、2,3,7,8-TCDD相当量である毒性等量(TEQ)に換算し、この換算値をダイオキシン分析値として用いている。従って、データ解析を含め被検体の分析に多大な時間を要する。これらの理由から、ダイオキシン類のより簡便で安価かつ高感度な測定方法の開発が強く望まれている。

10

15

また、特定の指標物質を測定することにより、より簡便にダイオキシン量(TEQ)を把握しようという考え方が根強く存在している。前駆体であるクロロベンゼンを測定する方法もこの1つである。近年、ダイオキシン異性体の1つである2,3,4,7,8-PeCDF量が、ダイオキシン類の総TEQと非常に高い相関性を有することが明らかになってきた(高音ら、第11回環境化学討論会講演要旨集、136頁、2002年)。土壤、底質、大気、水質、排ガス、飛灰などの環境試料、母乳、血液などの生体試料、ならびに、海産物、食品などの広範な試料においても、2,3,4,7,8-PeCDFは、全ダイオキシンの主要構成成分であり、その含有量はダイオキシン類の総TEQとR=0.96~0.99の高い相関を示す。従って、2,3,4,7,8-PeCDFは、ダイオキシン量を把握するための指標物質として注目されている。

20

25

一方、抗体を利用してダイオキシン類を定量する試みも行われている。

例えば、特開2002-340882号公報には、ダイオキシン類の捕集ユニット、抽出ユニット、分離精製ユニット、および抗体を用いてダイオキシン類を

測定する測定ユニットの4つのユニットから構成されるダイオキシン類の測定装置および測定方法が記載されている。

また、特開2002-228660号公報には、2, 3, 7, 8-T C D Dに高親和性のモノクローナル抗体を作製し、これを用いてヒト血液や母乳などの生体試料中のダイオキシン類を検出する方法が記載されている。

さらに、特開2002-119279号公報には、ダイオキシン類である複数の異性体に対して交差反応性を有する数種の抗体を用い、ダイオキシン類の存在量を推定する方法が記載されている。

しかし、これらの文献には、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを認識するモノクローナル抗体、ならびに、該モノクローナル抗体をコードする遺伝子配列、該遺伝子配列に基づく組換抗体および該組換抗体を用いる2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fの測定方法については記載されていない。

また、これら文献の方法は、試料中に含まれるダイオキシン類のT E Qを把握するには至らないという欠点を有する。

15

発明の開示

(発明が解決しようとする技術的課題)

本発明者らは、H R G C / H R M S法で測定される17種類のダイオキシン類の主要構成成分であり、かつ、その含有量がダイオキシン類の総T E Qと高い相関性を有する指標異性体である2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定する方法を確立しようとした。

(その解決方法)

本発明者らは、上記課題を解決するために、2, 3, 4, 7, 8-P e C D F誘導体を抗原として用いて、通常の細胞融合法により、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを認識するモノクローナル抗体を產生する2株のハイブリドーマ、即ち、モノクローナル抗体D x 3860を產生するハイブリドーマD x 3860 r 1およびモノクローナル抗体D x 3150を產生するハイブリドーマD x 3150 r 1を得た。

また、本発明者らは、これらのハイブリドーマ中に含まれるm R N Aを単離お

5 よび精製し、このmRNAをもとにcDNAを合成した。次いで、このcDNAの中から、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域ならびにモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAを選択するため、抗体遺伝子特有の配列を利用してPCRを行い、目的の抗体遺伝子を特異的に増幅させた。これら選択されたcDNAの塩基配列を解析し、それらがコードするアミノ酸配列を推定した。

10 その結果、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAは、それぞれ配列番号1および2で示され、一方、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAは、それぞれ配列番号3および4で示されることがわかった。

15 また、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域の推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号5および6で示され、一方、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域の推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号7および8で示されることがわかった。

さらに、本発明者らは、上記抗体の可変領域中の超可変領域(CDR1～3)のアミノ酸配列およびその位置を特定した。超可変領域のアミノ酸配列を以下の表1～4に示す。

表1：Dx3860のH鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala	配列番号 9
CDR 2	Phe-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Thr	配列番号 10
CDR 3	Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly-Pro-Ala-Tyr	配列番号 11

表2：Dx3860のL鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Leu-Asn-Tyr	配列番号 12
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu	配列番号 13

表3: Dx3150のH鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Tyr	配列番号 1 4
CDR 2	Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Tyr-Asn	配列番号 1 5
CDR 3	Val-Ser-Tyr-Gly-Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr	配列番号 1 6

表4: Dx3150のL鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Ser-Asn-Tyr	配列番号 1 7
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Asn-Thr-His-Leu-Val	配列番号 1 8

モノクローナル抗体Dx3860のH鎖およびL鎖可変領域中の超可変領域(CDR 1～3)の位置を、DNA配列およびアミノ酸配列と共に、それぞれ図1および図2に示す。また、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖およびL鎖可変領域中の超可変領域(CDR 1～3)の位置を、DNA配列およびアミノ酸配列と共に、それぞれ図3および図4に示す。

図1において、アミノ酸配列の26～33位がCDR 1を、51～57位がCDR 2を、96～103位がCDR 3を示す。

図2において、アミノ酸配列の26～34位がCDR 1を、52～54位がCDR 2を、91～98位がCDR 3を示す。

図3において、アミノ酸配列の26～34位がCDR 1を、52～58位がCDR 2を、97～107位がCDR 3を示す。

図4において、アミノ酸配列の26～34位がCDR 1を、52～54位がCDR 2を、91～99位がCDR 3を示す。

また、本発明者らは、上記抗体の可変領域をコードするDNAを発現ベクターに組込み、該ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞において組換抗体を発現させた。さらに、本発明者らは、該組換抗体を用いて、試料中の2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを定量しうることを確かめた。また、本発明者らは、上記抗体の可変領域をコードするDNAに変異を導入し、この変異導入DNAを用いて上記のように組換抗体を発現させ、該組換抗体を用いて、試料中の2, 3, 4, 7, 8-

P e C D F を定量しうることを確かめた。

即ち、本発明は、2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン(2, 3, 4, 7, 8-P e C D F)に結合活性を有する組換抗体であって、

(1) 2, 3, 4, 7, 8-P e C D F を認識するモノクローナル抗体D x 3 8 6 0 のH鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(2) 該モノクローナル抗体D x 3 8 6 0 のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(3) 2, 3, 4, 7, 8-P e C D F を認識するモノクローナル抗体D x 3 1 5 0 のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(4) 該モノクローナル抗体D x 3 1 5 0 のL鎖可変領域を構成し、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(5) 上記(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D F に結合活性を有するポリペプチド；ならびに

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドのフラグメントであり、2, 3, 4, 7, 8-P e C D F に結合活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む組換抗体を提供するものである。

また、本発明は、上記の組換抗体のアミノ酸配列をコードするD N A、該D N Aを含むクローニングまたは発現ベクター、該ベクターで形質転換した形質転換体、該形質転換体を用いて該組換抗体を製造する方法、ならびに、該組換抗体を用いて2, 3, 4, 7, 8-P e C D F を免疫学的に捕獲および測定する方法を提供するものである。

(従来技術より有効な効果)

本発明の組換抗体を用いて、ダイオキシン類、特に2, 3, 4, 7, 8-P e C D F を、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定することができる。

図面の簡単な説明

図1は、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図2は、モノクローナル抗体Dx3860のL鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図3は、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図4は、モノクローナル抗体Dx3150のL鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図5は、scFvフラグメントDx3860HLの構成を示す。

図6は、scFvフラグメントDx3860LHの構成を示す。

図7は、scFvフラグメントDx3150HLの構成を示す。

図8は、scFvフラグメントDx3150LHの構成を示す。

図9は、抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF scFvを用いた間接競合イムノアッセイにより、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを測定した結果を示すグラフである。

図10は、H鎖可変領域ポリペプチド画分と抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF活性の関係を示すグラフである。

図11は、モノクローナル抗体Dx3860のV_H鎖変異体のアミノ酸配列を示す。

図12は、変異導入Dx3860 scFv提示ファージにより、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを測定した結果を示すグラフである。

図13は、変異導入Dx3860 scFv提示ファージの抗体価を比較するグラフである。

図14は、変異導入Dx3860 scFv提示ファージのDMSO存在下での反応性を比較するグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明で言う「抗体」には、生体内に存在する天然型抗体の他に、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域またはその組合せにより形成される、少なくとも1つの

抗原結合部位を有するポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドには、
例えば、H鎖またはL鎖の可変領域のみを含むポリペプチド、1組のH鎖フラグ
メントとL鎖からなるF_a b フラグメント、2組のH鎖フラグメントとL鎖から
なるF(a b')₂ フラグメント、H鎖可変領域とL鎖可変領域がリンカーにより
5 1本に結合された一本鎖組換抗体(s c F v)などが含まれる。

s c F v には、例えば、N末端側から「(H鎖可変領域)-(リンカー)-(L鎖可
変領域)」の順序で結合されたポリペプチド、ならびに、「(L鎖可変領域)-(リ
ンカー)-(H鎖可変領域)」の順序で結合されたポリペプチドが含まれる。リンカ
ーは、s c F v が抗原に結合する際に、H鎖可変領域およびL鎖可変領域が効率
10 良く折り疊まれるように、これらの領域の間に配置させるものである。このリン
カーハ、通常、5～15個のアミノ酸から構成されており、例えば、-(G 1 y₄
S e r)₃-を例として挙げることができる。本発明において使用するリンカーハ、
上記目的を達成できる限り、アミノ酸の数および種類に制限はない。

また、本発明の組換抗体においては、H鎖可変領域またはL鎖可変領域のN末
15 端側およびC末端側に、さらに適当なアミノ酸配列が付加されていてもよい。例
えば、以下の実施例において示すように、「(H鎖可変領域)-(リンカー)-(L鎖
可変領域)」ポリペプチドの場合には、H鎖可変領域のN末端側に分泌シグナル
領域を、L鎖可変領域のC末端側にエピトープタグ配列を付加することができる。
また、「(L鎖可変領域)-(リンカー)-(H鎖可変領域)」ポリペプチドの場合には、
20 L鎖可変領域のN末端側に分泌シグナル領域を、H鎖可変領域のC末端側にエピ
トープタグ配列を付加することができる。

本発明の組換抗体には、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域またはその組合せ
により形成される少なくとも1つの抗原結合部位を有するポリペプチドの他に、
これらポリペプチドと実質的に同じ機能を有する変異ポリペプチドが含まれる。
25 本発明で言う「実質的に同じ機能」とは、抗原に対する結合力が実質的に同じで
あることを意味する。即ち、配列番号5～8で示されるアミノ酸配列を有する本
発明の抗2, 3, 4, 7, 8-P e C D F抗体のH鎖およびL鎖の可変領域は、抗原
との結合力が実質的に同じである限り、1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置
換または付加変異を含むことができる。このような本発明の変異ポリペプチドは、

配列番号5～8で示されるアミノ酸配列に対して、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する。また、この変異は、図1～4に示される抗体可変領域中の超可変領域(CDR1～3)以外のフレームワークに存在するのが好ましい。

5 また、本発明の組換抗体には、配列番号5～8で示されるポリペプチドのフラグメントであって、元のポリペプチドと実質的に同じ機能を有するフラグメント、ならびに、これらフラグメントの組合せにより形成されるポリペプチドが含まれる。これらのフラグメントは、図1～4に示される超可変領域(CDR1～3)の少なくとも1つ、好ましくは2つ、さらに好ましくは3つ全てを含有する。

10 本発明の組換抗体は、所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを調製し、該DNAを発現ベクターに組込み、該発現ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞を適当な培地で培養して該組換抗体を発現させることにより製造することができる。

15 所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、配列番号1～4(または図1～4)に示されるcDNA配列またはアミノ酸配列に基づいて、合成により調製することができる。別法によれば、所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、次のようにして得ることもできる。即ち、本発明者らは、以下の実施例において示すように、N末端側からモノクローナル抗体D_x3860のH鎖可変領域、リンカー、D_x3860のL鎖可変領域を、この順序で20 含むフラグメント(図5を参照)を組込んだ発現ベクターを作製し、このベクターを大腸菌Bに導入し、この大腸菌B(pET22Δ-D_x3860HL)を特許生物寄託センターに寄託した。さらに、本発明者らは、N末端側からモノクローナル抗体D_x3150のH鎖可変領域、リンカー、D_x3150のL鎖可変領域を、この順序で含むフラグメント(図7を参照)を組込んだ発現ベクターを作製し、このベクターを大腸菌K-12に導入し、この大腸菌K-12(pET22Δ-D_x3150HL)を特許生物寄託センターに寄託した。所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、これらの発現ベクターから適当な制限酵素を用いて切出し、所望によりDNA配列中に変異を加えることにより得ることができる。また、DNAフラグメントの連結のために、常法によりフラグメントの末端を修

飾することができる。

得られたDNAフラグメントの発現ベクターへの組込みは、市販の発現ベクター[例えば、p E T-2 2 b (+)など]の所定のフラグメント挿入部位に合致させるように、DNAフラグメントの末端を加工し、末端加工されたDNAフラグメントを発現ベクターに挿入することによって行うことができる。

このようにして得た発現ベクターを、適当な宿主細胞、特に大腸菌[例えば、大腸菌B株、K-12株、BL21(DE3)株など]に導入し、挿入したDNAフラグメントの発現に適した培地で宿主細胞を培養することにより、所望の組換抗体を発現させることができる。発現された組換抗体を、常法により宿主細胞またはその培養液から回収することができる。回収した組換抗体は、例えばクロマトグラフィー法によって精製することができる。

この方法により、所望の組換抗体を、血清を必要とする培地で動物細胞を培養することにより得られるモノクローナル抗体より安価に、かつ大量に製造することができる。

得られた組換抗体を用いて試料中の2, 3, 4, 7, 8-P_eCD_Fを免疫学的に、迅速に捕獲することができる。このような捕獲法としては、イムノクロマトグラフィーや免疫沈降による2, 3, 4, 7, 8-P_eCD_Fの分離、精製および濃縮方法が含まれる。また、このような2, 3, 4, 7, 8-P_eCD_Fの捕獲作用を利用することにより、該組換抗体を用いて生体中に摂取されたダイオキシン類のうち主要物質である2, 3, 4, 7, 8-P_eCD_Fを迅速に捕獲し、除去することも可能である。

また、得られた組換抗体を用いて試料中の2, 3, 4, 7, 8-P_eCD_Fを免疫学的に迅速かつ高感度に測定することができる。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫測定(EIA)、蛍光免疫測定(FIA)などが含まれる。

また、免疫学的測定法は非競合法と競合法に大別される。本発明の組換抗体は競合法に用いるのが好ましい。この競合法には、間接競合法と直接競合法が含まれる。間接競合法においては、2, 3, 4, 7, 8-P_eCD_F誘導体を固定化し、試料中の遊離2, 3, 4, 7, 8-P_eCD_Fと固定化抗原との間で、組換抗体との

反応を競合させる。直接競合法においては、組換抗体を固定化し、試料中の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の存在量に応じ、該組換抗体に結合する標識 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 誘導体の量を測定する。

5 実施例

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 抗体産生ハイブリドーマの調製

2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、次のようにして調製した。即ち、初めに 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF にアルキル鎖を導入し、その末端を活性エステル体とした。次いで、これを、常法に従い、キャリアータンパク質であるウシ血清アルブミン (BSA) に導入し、免疫用コンジュゲートを調製した。

この免疫用コンジュゲートを、アジュバント RAS R-700 (Ribi 社) 中に十分に乳化させ、この乳化液 200 μl を BALB/c マウス (7 週齢、雌) の腹腔内に投与して、マウスを免疫感作した。2 週間毎に追加免疫を行い、追加免疫より約 1 週間の経過後に尾静脈より採血し、血中抗体価を競合 EIA 法により測定した。

2, 3, 4, 7, 8-PeCDF に対する高い抗体産生が確認されたマウスを選択し、尾静脈内に免疫用コンジュゲートを投与して、最終免疫を行った。最終免疫より 3~4 日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。対数増殖期にあるマウス ミエローマ細胞 (Sp2/O) と脾臓細胞を細胞数が 1:5 になるように混合し、ポリエチレンギリコール法 (PEG 法) にて細胞融合を行った。10% FCS 含有 HAT 培地に懸濁し、96 ウエル培養プレートに分注 (1~2.5 × 10⁵ / ウエル) し、37°C、5% CO₂ 下で培養した。

培養開始より 7~10 日後、ハイブリドーマの増殖が見られたウエルの培養上清を一部採取し、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 誘導体-BSA コンジュゲートを固相化したマイクロタイタープレートに添加した。室温で 1 時間反応させた後、0.05% Tween 20 含有 PBS (-) で洗浄した。次いで、プレートにペルオキシダ

一ゼ標識抗マウス IgG (γ 鎖認識) 抗体 (KPL社) を加えて室温で 1 時間反応させた後、同様にプレートを洗浄した。基質溶液 (TMB 基質、KPL社) を加えてプレート上のペルオキシダーゼ活性を測定し、培養上清中の抗体価を求めた。高い抗体価を示すウエルのうち、固相化 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 誘導体-BSA コンジュゲートに対する抗体価が、20%DMSO に溶解した 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF によって大きく阻害されるウエルを選抜し、該ウエル中のハイブリドーマを限界希釀法によりクローニングした。クローニングにより単離された細胞を培養することによって、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を認識する 2 種類のモノクローナル抗体産生クローンを樹立した。

即ち、このようにして、モノクローナル抗体 Dx3860 を産生するハイブリドーマ Dx3860r1 およびモノクローナル抗体 Dx3150 を産生するハイブリドーマ Dx3150r1 を得た。

mRNA の単離および精製

抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 抗体産生ハイブリドーマ Dx3860r1 および Dx3150r1 を、5%CO₂ 通気条件下、10%FCS を含有する RPMI 1640 培地中で増殖させた。対数増殖期にある約 2.8~5.0 $\times 10^7$ 個の細胞から、AGPC 法 [Chomczynski, P., Sacchi, N., Anal. Biochem., 162, p. 156-159 (1987)] によって全 RNA を抽出した。次いで、オリゴdT がラテックスビーズに結合した Origotex-dT 30 (宝酒造) を用いて poly(A) + RNA を精製した。

cDNA の合成

Mouse scFv Module/Recombinant Phage Antibody System (Amersham Pharmacia社) に含まれる Primed first-strand reaction mix を用いて、上記の poly(A) + RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA を鑄型とし、Mouse Ig-Primer Set (Novagen) および Taq DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems社) を用いて PCR を行った。Dx3860H鎖には Mu Ig VH5'-A と Mu Ig VH3'-2 のプライマーセットを、Dx3150H鎖には Mu Ig VH5'-D と Mu Ig VH3'-2 のプライマーセットを用いた。また、Dx3860L鎖および Dx3150L鎖の両方には、Mu Ig λ VL5'-A と Mu Ig

g λ V_L 3'-1 のプライマーセットを用いた。用いたプライマーを以下の表 5 に示す。PCR 反応は次のように行った。即ち、Dx3860 H鎖と Dx3150 L鎖については、94°C × 1 分間、50°C × 1 分間、72°C × 1 分間の反応サイクルを 30 サイクル行い、Dx3150 H鎖については、94°C × 1 分間、60°C × 1 分間、72°C × 1 分間の反応サイクルを 30 サイクル行い、Dx3860 L鎖については、94°C × 1 分間、60°C × 1 分間、72°C × 1 分間の反応サイクルを 5 サイクル行い、その後さらに、94°C × 1 分間、50°C × 1 分間、72°C × 1 分間の反応サイクルを 30 サイクル行った。

表 5 : cDNA 合成用 PCR プライマー

H鎖 5'側		
Dx3860	MuIgV _H 5'-A	GGGAATTCA _T GRAS _T SKGGYT _T MARCTKGRT _T (配列番号19)
Dx3150	MuIgV _H 5'-D	ACTAGTCGACATGGRCAGR _T TACWTYYTCATT _C C _T (配列番号20)
		ACTAGTCGACATGATGGT _T TAAGT _C TCTGTACCT (配列番号21)
ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTR _T ATCATSYT _C TT (配列番号22)		
H鎖 3'側 (Dx3860、Dx3150共通)		
MuIgV _H 3'-2		CCCAAGCTTCCAGGGRCARKGGATARACIGRTGG (配列番号23)
L鎖 5'側 (Dx3860、Dx3150共通)		
MuIg λ V _L 5'-A		GGGAATTCA _T GGC _T GGAYTYC _T W _T MYTCT (配列番号24)
L鎖 3'側 (Dx3860、Dx3150共通)		
MuIg λ V _L 3'-1		CCCAAGCTTAGCTCYTC _T WGGA _T GGYGGRAA (配列番号25)

cDNA のサブクローニング

上記の PCR 産物を、TA クローニングキットである pGEM-T Easy Vector System I (Promega社) を用いて pGEM-T Easy に挿入した後、大腸菌 XL1-BLUE を形質転換した。コンピテントセルとして、XL1-Blue Competent Cells (STRATAGENE社) を使用した。

塩基配列の決定とアミノ酸配列の解析

pGEM-T Easy にサブクローニングした抗体遺伝子 cDNA クローンについて、T7 プライマー (5'-TAATACGACTCACTATAGGG : 配列番号 26) を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems

社)によるシークエンス反応を行った。次いで、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社)にて配列を解析した。その結果、D x 3 8 6 0 抗体遺伝子のH鎖およびL鎖可変領域をコードする c DNAの塩基配列およびその推定アミノ酸配列(配列番号1および2)ならびにD x 3 1 5 0 抗体遺伝子のH鎖およびL鎖可変領域をコードする c DNAの塩基配列およびその推定アミノ酸配列(配列番号3および4)を得た。塩基配列の解析ならびにアミノ酸配列の推定および解析には、解析ソフトDNAsis(日立ソフトエンジニアリング)を使用した。

また、配列番号1～4の配列中に含まれる超可変領域は、ImMunoGeneTicsデータベース(<http://imgt.cines.fr>)の分類に従って特定した。このデータベースは、Lefranc, M.-P. ら[Nucleic Acids Research, 27, p. 209-212 (1999)]、Ruiz, M. ら[Nucleic Acids Research, 28, p. 219-221 (2000)]、および、Lefranc, M.-P. [Nucleic Acids Research, 29, p. 207-209 (2001)]の論文を参照して作成されている。特定した超可変領域(CDR 1～3)の位置を、DNA配列およびアミノ酸配列と共に、図1～4に示す。

発現ベクターpET22Δの作製

市販ベクターであるpET-22b(+) (Novagen社)の制限酵素サイトXba I - Nco I 間の配列を、市販ベクターであるpET-3d (Novagen社)の制限酵素サイトXba I - Nco I 間の配列に置換して、T7/1a c プロモーター、ヒスチジンタグおよびT7ターミネーターを有する発現ベクターpET22Δを作製した。この発現ベクターpET22Δを、制限酵素Nco I (New England BioLabs社)とNot I (東洋紡社)で切断し、その末端をCalf intestine Alkaline Phosphatase(東洋紡社)により脱リン酸化処理した。0.7%アガロースゲル電気泳動により、切断したpET22Δのバンドを分離し、ゲルを切り出し、MagExtractor-PCR & Gel Clean Up-(東洋紡社)を用いてDNAをゲルより抽出した。このNco I - Not I サイトに、以下のようにscFvフラグメントを組込み、これをscFv発現ベクターとした。

cDNAからのscFvフラグメントの作製

クローニングした抗体遺伝子のH鎖およびL鎖のcDNAを、リンカ一配列をコードするDNAにより連結し、これを発現ベクターに組込むために、制限酵素

配列を含むプライマーを用いて、H鎖およびL鎖のcDNAをPCRで増幅した。Dx3150H鎖は、BamHIサイトの配列をGGATCCからGGATTCに変更し、かつ、BamHIサイトの前後の配列を含むようにプライマーを設計し、H鎖DNAを5'側と3'側の2つに分け増幅した。リンカーDNAは、fill-inによりH鎖およびL鎖のcDNAを連結するために、これらの配列の一部を含むプライマーによりPCRで増幅した。これによって、一本鎖抗体のアミノ末端側がH鎖となるものには、H鎖センスDNA3'端側の配列をリンカーDNAの5'端側に、L鎖センスDNA5'端側の配列をリンカーDNAの3'端側に附加した。また、一本鎖抗体のアミノ末端側がL鎖となるものには、L鎖センスDNA3'端側の配列をリンカーDNAの5'端側に、H鎖センスDNA5'端側の配列をリンカーDNAの3'端側に附加した。H鎖、L鎖およびリンカーDNAの増幅に用いたプライマーの組合せを表6および表7に示す。

表6 : scFv構築用PCRプライマー

<u>リンカー用オリゴ(センス)</u>		
GGA GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCC		(配列番号27)
<u>Dx3860 HL</u>		
・H鎖		
3860H 5' (Nco)	G ACC ATG GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GG	(配列番号28)
3860H 3' (Mro)	CC TCC GGA AGA GAC AGT GAC CAG GGT ACC TTG GC	(配列番号29)
・L鎖		
3860L 5' (Bam)	GC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号30)
3860L 3' (Not)	G AGC GGC CGC GCC TAG GAC ACT CAG TTT GGT	(配列番号31)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3860H)	GGT ACC CTG GTC ACT GTC TCT TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号32)
リンカー 3' (3860L)	AGA TTC CTG AGT CAC AAC AGC CTG GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号33)
<u>Dx3860 LH</u>		
・L鎖		
3860L 5' (Nco)	G ACC ATG GCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号34)
3860L 3' (Mro)	CC TCC GGA GCC TAG GAC AGT CAG TTT GGT TCC TCC	(配列番号35)
・H鎖		
3860H 5' (Bam)	GC GGA TCC GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GG	(配列番号36)
3860H 3' (Not)	G AGC GGC CGC TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT	(配列番号37)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3860L)	ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号38)
リンカー 3' (3860H)	CCC GGA CTC CAC CAG CTT CAC TTC GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号39)

表7: scFv構築用PCRプライマー(続き)

<u>Dx3150 HL</u>		
・H鎖(5'側)		
3150H 5' (Nco)	G ACC ATG GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CC	(配列番号40)
3150H (128at)	CC TGG AAA CTG CCG AAT CCA GTT CCA GT	(配列番号41)
・H鎖(3'側)		
3150H (101sn)	AC TGG AAC TGG ATT CGG CAG TTT CCA GG	(配列番号42)
3150H 3' (Mro)	CC TCC GGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT ACC TTG GC	(配列番号43)
・L鎖		
3150L 5' (Bam)	GC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号44)
3150L 3' (Not)	G AGC GGC CGC GCC TAG GAC AGT CAG TCT GGT	(配列番号45)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3150H)	GGT ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号46)
リンカー 3' (3150L)	AGA TTC CTG AGT CAC AAC AGC CTG GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号47)
<u>Dx3150 LH</u>		
・L鎖		
3150L 5' (Nco)	G ACC ATG GCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号48)
3150L 3' (Mro)	CC TCC GGA GCC TAG GAC AGT CAG TCT GGT TCC TCC	(配列番号49)
・H鎖(5'側)		
3150H 5' (Bam)	GC GGA TCC GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GG	(配列番号50)
3150H (128at)	CC TGG AAA CTG CCG AAT CCA GTT CCA GT	(配列番号51)
・H鎖(3'側)		
3150H (101sn)	AC TGG AAC TGG ATT CGG CAG TTT CCA GG	(配列番号52)
3150H 3' (Not)	G AGC GGC CGC TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT	(配列番号53)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3150L)	ACC AGA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号54)
リンカー 3' (3150H)	TCC TGA CTC CTG AAG CTG TAC ATC GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号55)

PCR增幅を、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社)を使用し、
 rTaq DNAポリメラーゼ(東洋紡社)を用いて、次のように行った。即ち、
 5 94°C×1分間、58°C×1分間、72°C×1分間の反応サイクルを5サイクル行い、さらに94°C×1分間、48°C×1分間、72°C×1分間の反応サイクルを20サイクル行った。PCR增幅の後、各PCR産物を3%アガロースゲル電気泳動により分離した。DNAフラグメントを含むゲルを切り出し、
 MagExtractor -PCR & Gel Clean Up-(東洋紡社)を用いてDNAをゲルから抽出

した。次いで、抽出したH鎖、L鎖およびリンカーDNAの3種類のDNAを混合し、*r T a q* DNAポリメラーゼ(東洋紡社)を用いて94°C×1.5分、65°C×3分の反応サイクルを20サイクル行うか、あるいは、*P f u* DNAポリメラーゼ(STRATAGENE社)を用いて95°C×1.5分、65°C×6分の反応サイクルを20サイクル行うことにより、H鎖、L鎖およびリンカーDNAを連結した。

5 このように連結したscFvフラグメントを、それがコードするアミノ酸配列と共に、図5～8(配列番号56～59；アミノ酸配列のみは配列番号60～63)に示した。

10 図5(配列番号56)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域、リンカー、Dx3860のL鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3860HL)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1～114位はH鎖可変領域を、115～129位はリンカーを、130～239位はL鎖可変領域を示す。

15 図6(配列番号57)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のL鎖可変領域、リンカー、Dx3860のH鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3860LH)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1～110位はL鎖可変領域を、112～126位はリンカーを、127～240位はH鎖可変領域を示す。

20 図7(配列番号58)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域、リンカー、Dx3150のL鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3150HL)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1～118位はH鎖可変領域を、119～133位はリンカーを、134～243位はL鎖可変領域を示す。

25 図8(配列番号59)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3150のL鎖可変領域、リンカー、Dx3150のH鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3150LH)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1～110位はL鎖可変領域を、112～126位はリンカーを、127～244位はH鎖可変領域を示す。

さらに、得られた s c F v フラグメントを増幅するために、反応溶液に s c F v の両端(Nco I -Not I)に対応するプライマーを加えてPCRを行った。D x 3 8 6 0 については、94°C×1分、67°C×1分、72°C×2分の反応サイクルを5サイクル行い、さらに94°C×1分、60°C×1分、72°C×2分の反応サイクルを20サイクル行った。D x 3 1 5 0 については、95°C×1分、62°C×1分、75°C×4分の反応サイクルを5サイクル行い、さらに95°C×1分、55°C×1分、75°C×4分の反応サイクルを20サイクル行った。PCR産物を、1.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、s c F v のDNAフラグメント(730～740 bp)を含むゲルを切り出し、DNAフラグメントをゲルから抽出した。次いで、このDNAフラグメントの末端を、制限酵素Nco I (New England BioLabs社)およびNot I (東洋紡社)により処理し、再度 MagExtractorにより精製した。

s c F v DNAフラグメントを、発現ベクター p E T 2 2 Δ のNco I -Not I サイトに挿入し、この発現ベクターで大腸菌X L 1 -B l u e を形質転換した。ライゲーションにはDNA Ligention Kit Ver. 2(宝酒造社)を用い、コンピテントセルとしてXL1-Blue Competent Cells(STRATAGENE社)を使用した。サブクローニングしたクローンについて、s c F v 部分の配列を解析し、正しい配列を有するクローンを選択して s c F v の発現に用いた。このようにして、s c F v フラグメントD x 3 8 6 0 H L を含む発現ベクター p E T 2 2 Δ -D x 3 8 6 0 H L ならびに s c F v フラグメントD x 3 1 5 0 H L を含む発現ベクター p E T 2 2 Δ -D x 3 1 5 0 H L を得た。

発現ベクター p E T 2 2 Δ -D x 3 8 6 0 H L は、大腸菌Bに導入し、大腸菌B(p E T 2 2 Δ -D x 3 8 6 0 H L)として、また、発現ベクター p E T 2 2 Δ -D x 3 1 5 0 H L は、大腸菌K-12に導入し、大腸菌K-12(p E T 2 2 Δ -D x 3 1 5 0 H L)として、平成15年2月27日に独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、それぞれ受託番号F E R M B P - 8 3 0 5 およびF E R M B P - 8 3 0 6 を取得した。

大腸菌での発現

s c F v フラグメントD x 3 8 6 0 H L が組込まれた発現ベクター p E T 2 2

Δ-D x 3860HLで形質転換した大腸菌 Origami B (DE3) (Novagen社)を、LB培地300m1中、OD600が約0.5になるまで37°Cで培養した。次いで、培養温度を25°Cに下げて培養を続けた。OD600が約1.0になった時5点で、IPTG(イソプロピルチオガラクトシド)を終濃度が1mMになるように添加し、終夜培養して、scFvの発現を誘導した。遠心により菌体約1gを回収した後、50mMトリス-HCl(pH8.0)、0.1M NaCl中に懸濁し、リゾチーム(終濃度0.2mg/m1)およびTriton X-100(終濃度1%)を加えて溶菌した。遠心(15,000×g、20分間)により沈殿を回収し、沈殿を1.0% Triton X-100を含む緩衝液で2回洗浄し、scFvを含む沈殿を10約100mg得た。

scFvの再構成

封入体として得られたscFvを、25mM PB、350mM NaCl、6Mグアニジン・HC1(pH7.4)の緩衝液中に加え、4°Cで終夜静置して溶解した。遠心(10,000×g、15分間)により残渣を除去した後、上記の緩衝液15にて平衡化したニッケルキレートカラム(Qiagen社)に適用した。カラム容積の約5～10倍量の緩衝液にてカラムを十分に洗浄した後、20%グリセロールおよび400mMアルギニンを含む上記緩衝液に交換した。6Mから0Mまでのグアニジン・HC1のグラジエントを用いて、キレートカラム上に結合したscFvを再構成させた。25mM PB、350mM NaCl、20%グリセロール、50mMイミダゾールの溶液(pH7.4)でカラムを洗浄した後、イミダゾール濃度を300mMに上げてscFvを溶出させた。

抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF scFvを用いた間接競合イムノアッセイによる2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの測定

マイクロタイタープレートに2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体-BSAコンジ25ュゲート(1μg/m1)50μlを加え、室温で1時間反応させた。0.05%Tween 20含有PBS(−)でマイクロタイタープレートの各ウエルを洗浄し、ブロックエース(雪印社)を加え、室温で2時間静置してブロッキングを行った。マイクロタイタープレートを洗浄後、各濃度に調製した2, 3, 4, 7, 8-PeCDF(20% DMSO溶液)25μlと抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF scFvの溶

液 25 μ l を添加し、室温で 0.5 ~ 1 時間反応させた。再度マイクロタイヤー
プレートを洗浄した後、2000 倍希釈した抗tetra-His 抗体 (Qiagen 社) を加え、
室温で 1 時間反応させた。次いで、3000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗
マウス IgG (γ 鎖認識) 抗体 (KPL 社) 50 μ l を添加し、室温で 1 時間反応させ
た。マイクロタイヤープレートの各ウエルを十分に洗浄して未反応液を除去した
後、基質溶液 (TMB 基質、KPL 社) を加え、室温で 15 分間静置した。50 μ l
の 1M H_3PO_4 を添加して反応を停止させ、プレートリーダー (Labsystems 社)
により OD 450 (対照: OD 600) を測定した。この結果を図 9 にグラフで示
す。このグラフから、抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF scFv により、高感度に
2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を測定できることが明らかである。

H鎖可変領域ポリペプチドの 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 結合活性の確認

発現ベクター pET22Δ-D_x3860HL の L鎖可変領域を含む制限酵素
サイト BamHI-NotI 間の配列を除去して作製した発現ベクター pET22Δ-
D_x3860H を用いて大腸菌 Origami B (DE3) (Novagen 社) を形質転換した。
この形質転換体を用いて、scFv と同様に、H鎖可変領域ポリペプチド (配列
番号 5 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド) の発現を行った。

封入体として得られた H鎖可変領域ポリペプチドを、上記と同様に、ニッケル
キレートカラム上で再構成した後、イミダゾールを用いて単離および精製した。
キレートカラムより溶出された画分について、吸光度 (280 nm) を測定してタ
ンパク質濃度を求め、さらに、EIA 法により固相化した 2, 3, 4, 7, 8-Pe
CDF-BSA コンジュゲートへの反応性を検討した。この結果、図 10 に示す
ように、H鎖可変領域ポリペプチド画分に抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 活性を
認め、H鎖可変領域ポリペプチドが 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF に結合活性を有
することを確認した。

H鎖への変異導入と変異体の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 結合活性の確認

モノクローナル抗体 D_x3860 の遺伝子配列をもとに、変異導入抗体遺伝子
ライブラリーの作製を行った。抗体の H鎖可変領域 (V_H) の遺伝子を鑄型とし、
5' 側および 3' 側の配列に制限酵素サイトを付加したプライマーを設定し、
error-prone PCR により変異を導入した。error-prone PCR は、Taq D

NAポリメラーゼが増幅中にしばしば読み間違えを起こす性質を利用し、さらに塩化マンガンの添加によりPCRの際の読み間違いを意図的に誘発し、ランダムな変異を導入する方法である。このPCR産物を、制限酵素による末端の処理と精製の後、その制限酵素サイトを利用して単鎖抗体発現ファージミドのH鎖遺伝子と置き換え、これを用いて大腸菌TG1を形質転換した。

形質転換した大腸菌の培養液10mlに、アンピシリンを終濃度100μg/mlとなるように、また、M13KO7ファージを終濃度4×10⁹pfu/mlとなるよう添加し、37℃で1時間培養した。遠心分離により菌体を回収し、アンピシリン100μg/mlとカナマイシン50μg/mlを含む2×YT培地10mlに再懸濁し、37℃で終夜培養して培地中に単鎖抗体提示ファージを産生させた。培養液を遠心分離し、大腸菌菌体を除いた培養上清10mlに対し、2.5M NaCl含有20%ポリエチレングリコール溶液2mlを加え、混和した。氷上で1時間静置した後、冷却下、遠心分離(10000g×20分)した。上清を完全に除去した後、得られた沈殿を10倍希釈ブロックエース(雪印社)1mlに溶解させ、単鎖抗体提示ファージ溶液とした。

調製した単鎖抗体提示ファージから、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体、2, 3, 7, 8-TCDF誘導体、およびクロロベンゼン誘導体に対する反応性の高いクローンを濃縮するため、バイオパニングを行った。調製したファージ溶液を、まずブロッキング剤のみを固相化したマイクロタイタープレート中でプレインキュベート(100μl/ウェル、室温、1時間)することにより、非特異的結合を排除した。次いで、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体、2, 3, 7, 8-TCDF誘導体、およびクロロベンゼン誘導体の各BSAコンジュゲートを固相化してブロックエースでブロッキングしたマイクロタイタープレートに移し(100μl/ウェル)、8%DMSO存在下に室温で1時間反応させた。反応終了後、プレートの各ウェルに8%DMSOおよび0.1%Tween 20含有PBS(-)300μlを添加し、ピペッティングし、5分間静置した後、洗浄緩衝液を廃棄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、洗浄液を完全に除去し、0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH 2.2)100μl/ウェルを加え、10分間静置した。ピペッティングを行って、固相化抗原から遊離した単鎖抗体提示ファージを回収し、直ちに

トリス溶液(pH 8.0)を加えて中和した。

2×YT培地2.5m1中で培養した大腸菌TG1(OD_{600nm}=0.3)の培養液に、バイオパニングにより回収したファージ溶液を混和し、37°Cで1時間培養してファージを再感染させた。次に、アンピシリン(終濃度100μg/m1)およびグルコース(終濃度2%)を含む培養液に、終濃度4×10⁹pfu/m1となるようM13KO7ファージを添加し、さらに37°Cで1時間培養を行った。遠心分離により菌体を回収した後、アンピシリン100μg/m1とカナマイシン50μg/m1を含む2×YT培地10m1に再度懸濁し、37°Cで終夜培養した。これにより、単鎖抗体提示ファージを増幅し、培地中に產生させた(ファージレスキュ)。増幅したファージを、再びポリエチレングリコール沈殿により回収した。バイオパニングによる濃縮と再感染およびファージレスキュによる増幅を、3~5回繰り返した。

十分濃縮されたと考えられるファージクローンを、大腸菌TG1に感染させ、寒天平板培地にプレーティングし、30°Cで終夜培養して單一コロニー化した。スクリーニング条件ごとにTG1の單一コロニーから6クローンずつを無作為に選び、常法によりファージミドを調製し、これを鑄型としてBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems社)によるシーケンス反応を行った。ジェネティックアナライザABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社)により塩基配列を解析し、4種類のV_H鎖変異導入体(Dx3860HL-M#5、Dx3860LH-M#1、Dx3860LH-M#2、Dx3860LH-M#3)を得た。これらV_H鎖変異体のアミノ酸配列を、図11および配列番号64~67に示した。Dx3860野生型V_H(WT)と比較したところ、1~2個のアミノ酸の変異が見られた。また、変異導入箇所はCDR部位に特定されず、フレームワークにも認められた。

いずれの変異体も間接競合イムノアッセイにより2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識することを確認した(図12)。また、抗体価やDMSO中での反応性には差が見られ、抗体価およびDMSO中での安定性はいずれも、変異体の方が野生型を上回る結果を示した(図13および図14)。さらに、この傾向は形質転換した大腸菌[Origami B (DE3)]にて発現させた各scFvにおいても保持されてい

た。

産業上の利用の可能性

本発明により提供されるDNAを用いて宿主細胞内で発現させることにより、
2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識する組換抗体を大量に製造することができる。
このように製造された組換抗体は、親モノクローナル抗体より安価であり、それを用いて2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを免疫学的に捕獲することができ、免疫測定に応用することができる。また、変異を導入したDNAを用いることにより、さらに有利な特性を有する組換抗体、例えば、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFへの親和性が向上した組換抗体や安定性が改善された組換抗体などを製造することができ、生体成分である天然の抗体タンパク質が有する問題点の克服も可能となる。

5

10

請求の範囲

1. 2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン(2, 3, 4, 7, 8-PeCDF)に結合活性を有する組換抗体であって、

5 (1) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(2) 該モノクローナル抗体Dx3860のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

10 (3) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(4) 該モノクローナル抗体Dx3150のL鎖可変領域を構成し、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

15 (5) 上記(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチド；ならびに

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドのフラグメントであり、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチド；

20 からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む組換抗体。

2. (5)のポリペプチドが、(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に98%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチドである請求項1に記載の組換抗体。

3. モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチド、ならびに、モノクローナル抗体Dx3860のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有す

るアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチドを含む請求項1に記載の組換抗体。

4. モノクローナル抗体D x 3 1 5 0のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチド、ならびに、モノクローナル抗体D x 3 1 5 0のL鎖可変領域を構成し、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチドを含む請求項1に記載の組換抗体。

5. 請求項1に記載の組換抗体のアミノ酸配列をコードするDNA。

6. 請求項5に記載のDNAを含むクローニングまたは発現ベクター。

7. 請求項6に記載のクローニングまたは発現ベクターで形質転換した形質転換体。

10. 請求項1に記載の組換抗体の製造方法であって、請求項7に記載の発現ベクターで形質転換した形質転換体を適当な培地中で培養し、該形質転換体または培地から組換抗体を回収することを含んでなる方法。

15. 2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを免疫学的に捕獲する方法であって、請求項1に記載の組換抗体を使用することを特徴とする方法。

20. 2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを免疫学的に測定する方法であって、請求項1に記載の組換抗体を使用することを特徴とする方法。

1/11

第1図

Dx3860 VH

1	GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC	60
1	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu	20
61	TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT TCC TAT GCC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT	120
21	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr	40
	CDR1-IMGT	
121	CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT GGT ATC ACC TAC TAT CCA	180
41	Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro	60
	CDR2-IMGT	
181	GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT AAT GCC AGG AAC ATC CTG TAC CTG	240
61	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu	80
241	CAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATT TAT TAC TGT GCA AGA GGC TAT GGT	300
81	Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly	100
	CDR3-IMGT	
301	CCT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	342
101	Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	114
	CDR4-IMGT	

第2図

Dx3860 VL

1	CAG GCT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC	60
1	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu	20
61	ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT CTT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA	120
21	Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu	40
	CDR1-IMGT	
121	AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA CGT GTT	180
41	Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val	60
	CDR2-IMGT	
181	CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA	240
61	Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	80
241	CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TGT GCT CTA TGG TAC AGC AAC CAT TTG GTG TTC	300
81	Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Leu Val Phe	100
	CDR3-IMGT	
301	GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC	330
101	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	110

2/11

第3図

Dx3150 VH

1	GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG TCT CTG TCT CTC	60
1	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu	20
61	ACC TGT TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGC TTT TAC TGG AAC TGG ATC CGG CAG	120
21	Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln	40
	<u>CDR1-IMGT</u>	
121	TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG GGC TAC ATA AGC TAC GAC GGT TAC AAT AAT TAC	180
41	Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr	60
	<u>CDR2-IMGT</u>	
181	AAC CCA TTT CTC AAA AAT CGA GTG TCC ATC ACT CGT GAC ACA TCT GAG AAC CAG TTT TTC	240
61	Asn Pro Phe Leu Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe	80
241	CTG AAG TTG CAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCT ACA TAT TAC TGT GTA AGT TAC GGT	300
81	Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ser Tyr Gly	100
	<u>CDR3-IMGT</u>	
301	AGT CGG AGG GGA GTT ACC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA	354
101	Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	118
	<u>CDR3-IMGT</u>	

第4図

Dx3150 VL

1	CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC	60
1	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu	20
61	ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA	120
21	Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu	40
	<u>CDR1-IMGT</u>	
121	AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA GGT GTT	180
41	Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val	60
	<u>CDR2-IMGT</u>	
181	CCT GCC AGA TTC TCT GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA	240
61	Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	80
241	CAG ACT GAG GAT GAG GCG ATA TAT TTC TGT GCT CTT TGG TAC AAC ACC CAT TTG GTG TTC	300
81	Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe	100
	<u>CDR3-IMGT</u>	
301	GGT GGA GGA ACC AGA CTG ACT GTC CTA GGC	330
101	Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly	110

3/11

第5図

D x 3860H L scFv

1 GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC 60
 CTT CAC TTC GAC CAC CTC AGG CCC CCT CCG AAT CAC TTC GGA CCT CCC AGG GAC TTT GAG
 1 Glu-Val-Lys-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu 20
 VH →

61 TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT TCC TAT GCC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT 120
 AGG ACA CGT CGG AGA CCT AAG TGA AAG TCA AGG ATA CGG TAC AGA ACC CAA GCG GTC TGA
 21 Ser-Cys-Ala-Ala-Ser-Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala-Met-Ser-Trp-Val-Arg-Gln-Thr 40

121 CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT GGT ATC ACC TAC TAT CCA 180
 GGT CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT AGG AAA TCA TTA CCA CCA TAG TGG ATG ATA GGT
 41 Pro-Glu-Lys-Arg-Leu-Glu-Trp-Val-Ala-Ser-Phe-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Thr-Tyr-Tyr-Pro 60

181 GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT AAT GCC AGG AAC ATC CTG TAC CTG 240
 CTG TCA CAC TTC CCG GCT AAG TGG TAG AGG TCT CTA TTA CGG TCC TTG TAG GAC ATG GAC
 61 Asp-Ser-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Ile-Ser-Arg-Asp-Asn-Ala-Arg-Asn-Ile-Leu-Tyr-Leu 80

241 CAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATT TAT TAC TGT GCA AGA GGC TAT GGT 300
 GTT TAC TGG TCA GAC TCC AGA CTC CTG TGC CGG TAA ATA ATG ACA CGT TCT CCG ATA CCA
 81 Gln-Met-Thr-Ser-Leu-Arg-Ser-Glu-Asp-Thr-Ala-Ile-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly 100

301 CCT GCT TAC TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACT GTC TCT TCC CGA GGA GGC GGT TCA GGC 360
 GGA CGA ATG ACC CCG GTT CCA TGG GAC CAG TGA CAG AGA AGG CCT CCT CCG CCA AGT CCG
 101 Pro-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly 120

361 GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC 420
 CCT CCA CCG AGA CCG CCA CCG CCT AGG GTC CGA CAA CAC TGA GTC CTT AGA CGT GAG TGG
 121 Gln-His-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly 140
 Linker → VL →

421 ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT 480
 TGT AGT GGA CCA CTT TGT CAG TGT GAG TGA ACA GCG AGT TCA TGA CCC CGA CAA TGT TGA
 141 Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Val-Thr 160

481 CTT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT 540
 GAA TTG ATA CGG TTG ACC CAG GTT CTT TTT GGT CTA GTC AAT AAG TGA CCA GAT TAT CCA
 161 Leu-Asn-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu-Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Leu-Ile-Gly 180

541 AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA GGT GTT CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC 600
 TTA TGG TTG TTG GCT CGA GGT CCA CAA GGA CGG TCT AAG AGT CCG AGG GAC TAA CCT CTG
 181 Asn-Thr-Asn-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Leu-Ile-Gly-Asp 200

601 AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TGT GCT 660
 TTC CGA CGG GAG TGG TAG TGT CCC CGT GTC TGA CTC CTC CGT TAT ATA AAG ACA CGA
 201 Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Ile-Tyr-Phe-Cys-Ala 220

661 CTA TGG TAC AGC AAC CAT TTG GTG TTC GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC 717
 GAT ACC ATG TCG TTG GTA AAC CAC AAG CCA CCT CCT TGG TTT GAC TGA CAG GAT CCG
 221 Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu-Val-Phe-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Thr-Val-Leu-Gly 239

第6図

D x 3860 L H scFv

1 CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC 60
 GTC CGA CAA CAC TGA GTC CTT AGA CGT GAG TGG TGT AGT GGA CCA CTT TGT CAG TGT GAG
 1 Gln-Ala-Val-Val-Thr-Gln-Glu-Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Leu 20
 VL →
 ↓
 61 ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT CTT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA 120
 TGA ACA GCG AGT TCA TGA CCC CGA CAA TGT TGA GAA TTG ATA CGG TTG ACC CAG GTT CTT
 21 Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Leu-Asn-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu 40

121 AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA GGT GTT 180
 TTT GGT CTA GTA AAT AAG TGA CCA GAT TAT CCA TTA TGG TTG GTG GCT CGA GGT CCA CAA
 41 Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Leu-Ile-Gly-Asn-Thr-Asn-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val 60

181 CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA 240
 GGA CGG TCT AAG AGT CCG AGG GAC TAA CCT CTG TTC CGA CGG GAG TGG TAG TGT CCC CGT
 61 Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Leu-Ile-Gly-Asp-Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala 80

241 CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TGT GCT CTA TGG TAC AGC AAC CAT TTG GTG TTC 300
 GTC TGA CTC CTA CTC CGT TAT ATA AAG ACA CGA GAT ACC ATG TCG TTG GTA AAC CAC AAG
 81 Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Ile-Tyr-Phe-Cys-Ala-Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu-Val-Phe 100

301 GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC 360
 CCA CCT CCT TGG TTT GAC TGA CAG GAT CCG CCT CCG CCA AGT CCG CCT CCA CCG
 101 Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Thr-Val-Leu-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly 120
 Linker
 ↓
 361 TCT GGC GGT GGC GGA TCC GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT 420
 AGA CCG CCA CCG CCT AGG CTT CAC TTC GAC CAC CTC AGG CCC CCT CCG AAT CAC TTC GGA
 121 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Glu-Val-Lys-Leu-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro 140
 VH →
 ↓
 421 GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT TCC TAT GCC ATG 480
 CCT CCC AGG GAC TTT GAG AGG ACA CGT CGG AGA CCT AAG TGA AAG TCA AGG ATA CGG TAC
 141 Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu-Ser-Cys-Ala-Ala-Ser-Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala-Met 160

481 TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT 540
 AGA ACC CAA GCG GTC TGA GGT CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT AGG AAA TCA TTA CCA
 161 Ser-Trp-Val-Arg-Gln-Thr-Pro-Glu-Lys-Arg-Leu-Glu-Trp-Val-Ala-Ser-Phe-Ser-Asn-Gly 180

541 GGT ATC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT AAT GCC 600
 CCA TAG TGG ATG ATA GGT CTG TCA CAC TTC CCG GCT AAG TGG TAG AGG TCT CTA TTA CGG
 181 Gly-Ile-Thr-Tyr-Tyr-Pro-Asp-Ser-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Ile-Ser-Arg-Asp-Asn-Ala 200

601 AGG AAC ATC CTG TAC CTG CAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATT TAT TAC 660
 TCC TTG TAG GAC ATG GAC GTT TAC TGG TCA GAC TCC AGA CTC CTG TGC CGG TAA ATA ATG
 201 Arg-Asn-Ile-Leu-Tyr-Leu-Gln-Met-Thr-Ser-Leu-Arg-Ser-Glu-Asp-Thr-Ala-Ile-Tyr-Tyr 220

661 TGT GCA AGA GGC TAT GGT CCT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 720
 ACA CGT TCT CCG ATA CCA GGA CGA ATG ACC CCG GTT CCC TGA GAC CAG TGA CAG AGA CGT
 221 Cys-Ala-Arg-Gly-Tyr-Pro-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ala 240

第7圖

D x 3150 H L sc Fv

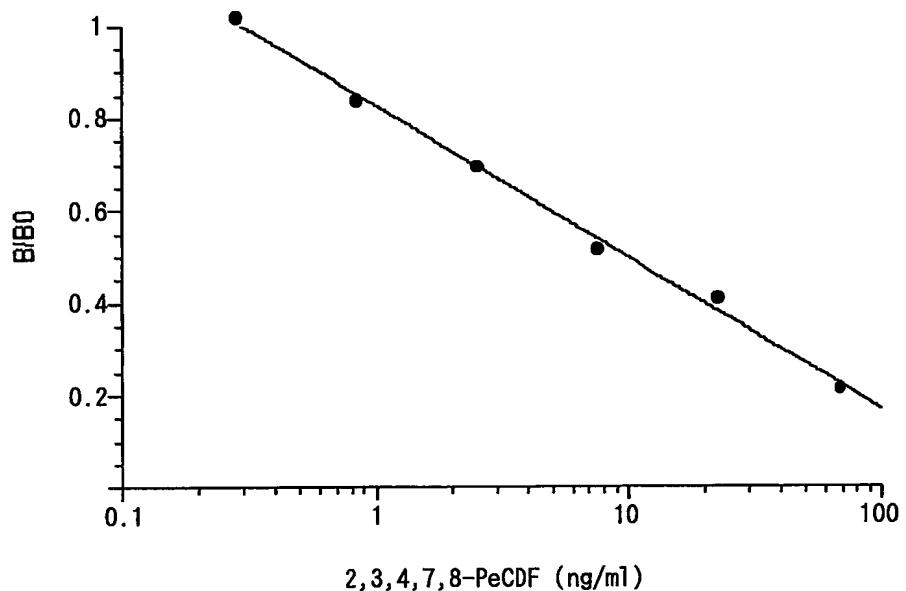
6/11

第8図

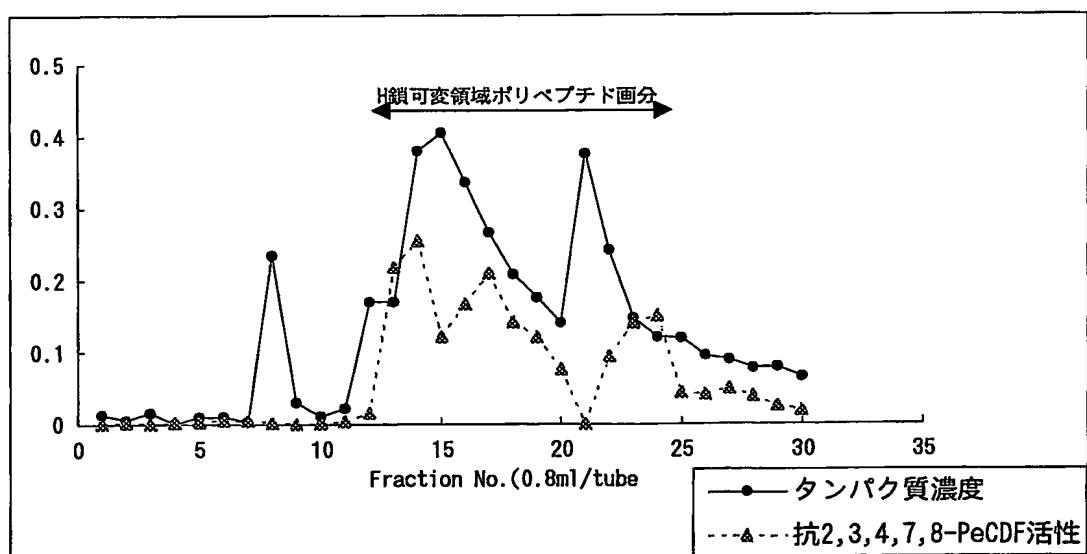
D x 3150 L H sc Fv

7/11

第9図



第10図



8/11

第11図

CDR 1

	10	20	30	40
WT	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQT			
HL-M# 5	-----			
LH-M# 1	-----R-----			
LH-M# 2	-----			
LH-M# 3	-----			

CDR 2

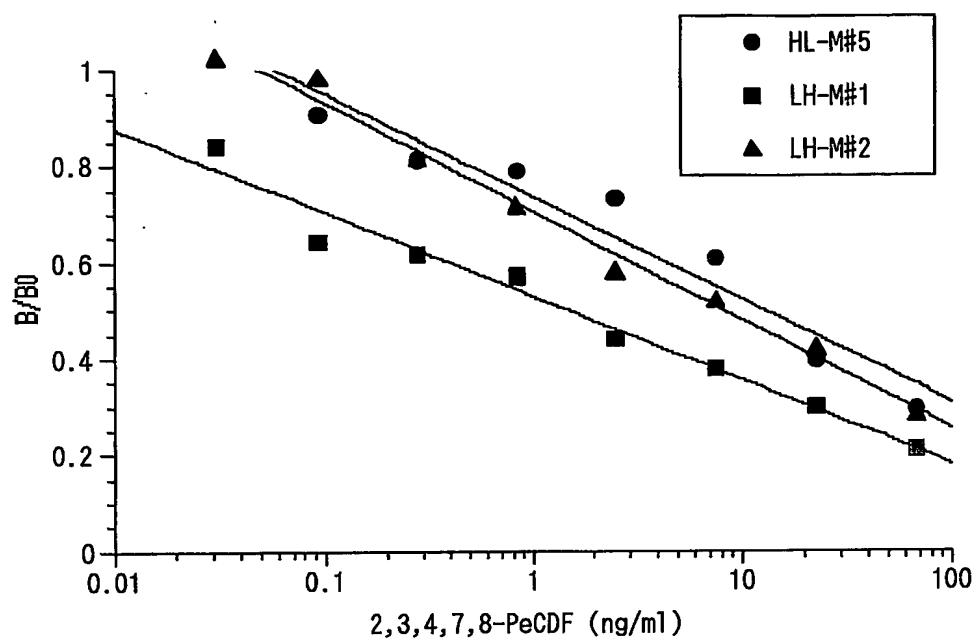
	50	60	70	80
WT	PEKRLEWVVAS <u>F</u> SNGGITYYPDSVKGRFTISRDNARNILYL			
HL-M# 5	-----I-----			
LH-M# 1	-----L-----			
LH-M# 2	-----V-----			
LH-M# 3	-----L-----		V-----	

CDR 3

	90	100	110	114
WT	QMTSLRSEDTAIYYC <u>ARGYGPAYWGQGT</u> LVTVSA			
HL-M# 5	-----		S-----	
LH-M# 1	-----		A-----	
LH-M# 2	-----	H-----	A-----	
LH-M# 3	-----		A-----	

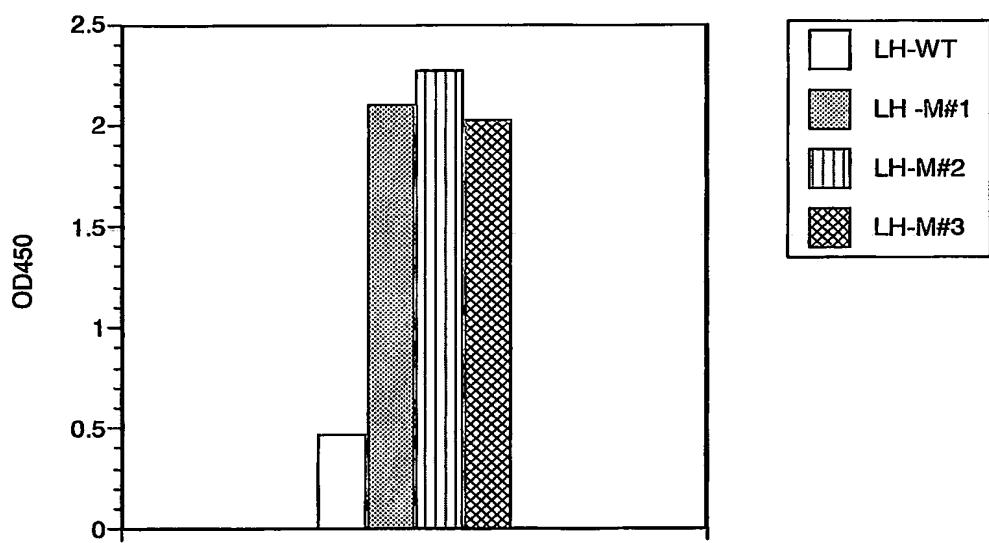
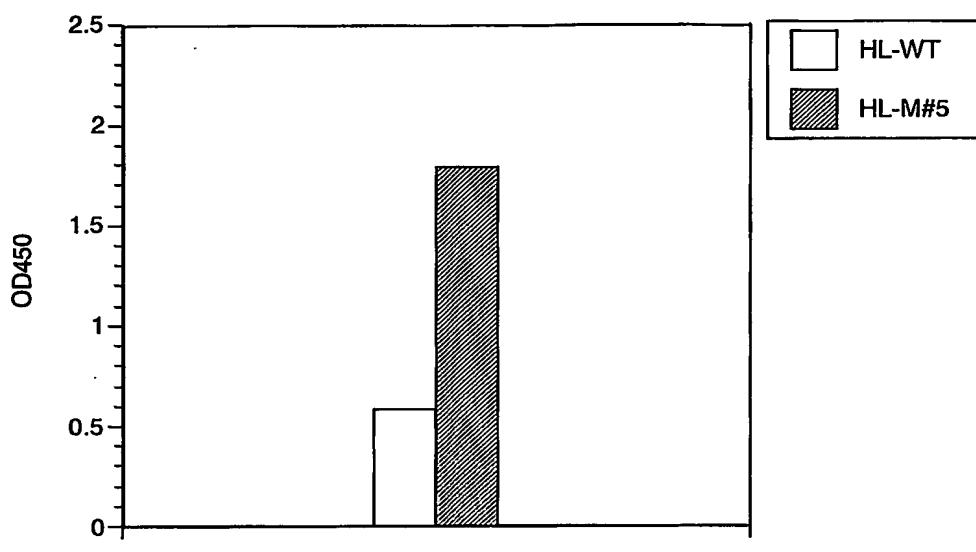
9/11

第12図



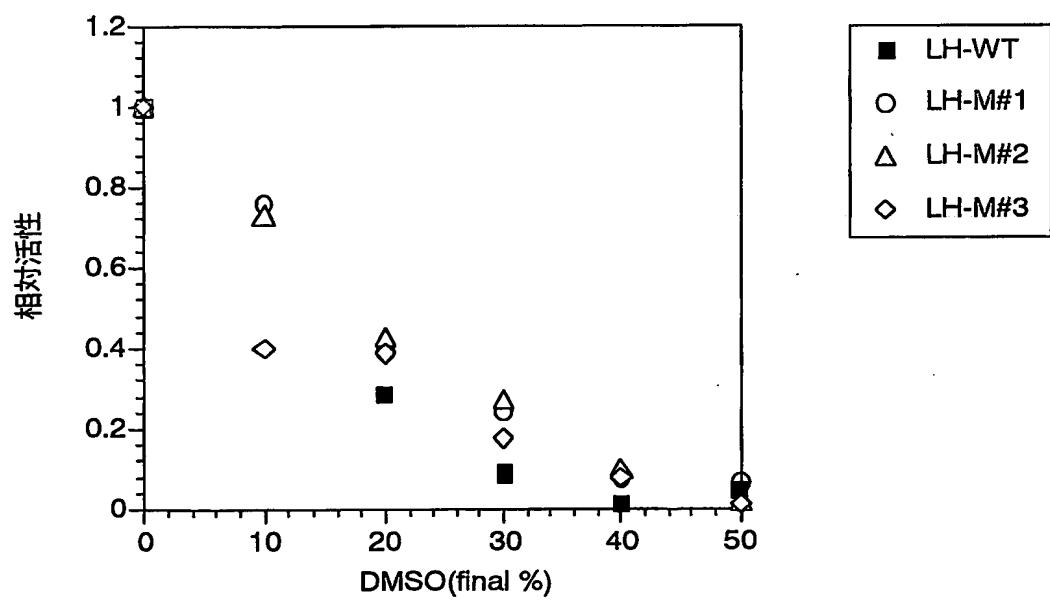
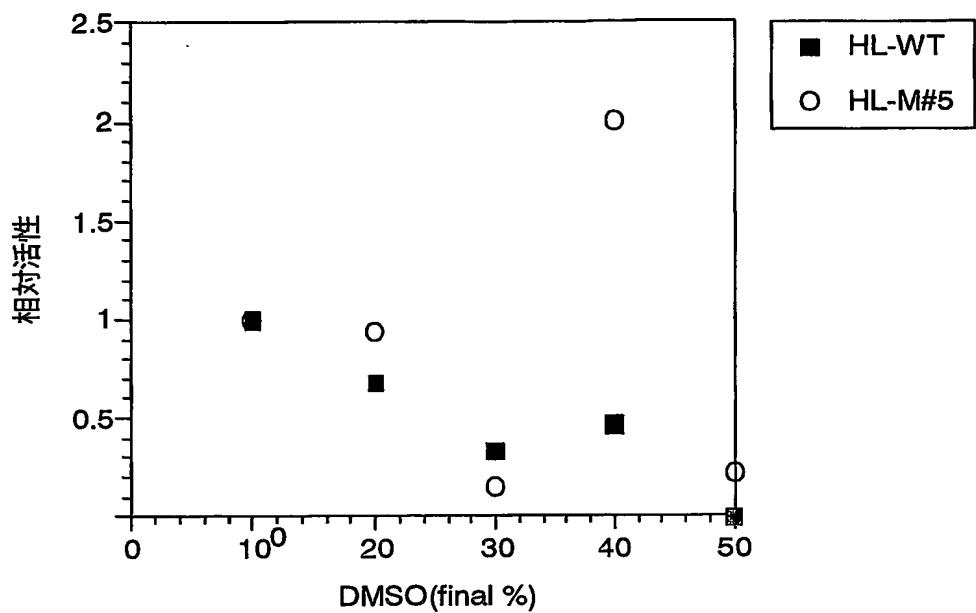
10/11

第13図



11/11

第14図



1/28

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd.

<120> Recombinant antibody recognizing dioxin
and gene encoding said antibody

<130> 664413

<150> JP 2003-091663

<151> 2003-03-28

<160> 67

<210> 1

<211> 342

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Inventor: Sawadaishi, Kazuyuki

Inventor: Higano, Keiichi

Inventor: Kataoka, Chiwa

<220>

<223> DNA encoding polypeptide of H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 1

gaa	gtg	aag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	tta	gtg	aag	cct	gga	ggg	48
Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
1	5									10			15			

tcc	ctg	aaa	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	act	ttc	agt	tcc	tat	96
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
20	25												30			

gcc	atg	tct	tgg	gtt	cgc	cag	act	cca	gag	aag	agg	ctg	gag	tgg	gtc	144
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
35								40				45				

gca	tcc	ttt	agt	aat	ggt	gtt	atc	acc	tac	tat	cca	gac	agt	gtg	aag	192
Ala	Ser	Phe	Ser	Asn	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	
50								55				60				

ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gat	aat	gcc	agg	aac	atc	ctg	tac	ctg	tat	240
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Tyr	Leu		
65								70				75		80			

caa	atg	acc	agt	ctg	agg	tct	gag	gac	acg	gcc	att	tat	tac	tgt	gca	288
Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
85								90				95				

2/28

aga ggc tat ggt cct gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc	336
Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
100 105 110	
tct gca	342
Ser Ala	
<210> 2	
<211> 330	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220>	
<223> DNA encoding polypeptide of L-chain variable region of	
monoclonal antibody Dx 3860	
<400> 2	
cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa	48
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu	
1 5 10 15	
aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act ctt	96
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu	
20 25 30	
aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt	144
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly	
35 40 45	
cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc	192
Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe	
50 55 60	
tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca	240
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	
65 70 75 80	
cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc aac	288
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn	
85 90 95	
cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc	330
His Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
100 105 110	
<210> 3	
<211> 354	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220>	
<223> DNA encoding polypeptide of H-chain variable region of	

3/28

monoclonal antibody Dx 3150

4/28

aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt	144
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly	
35 40 45	
cta ata ggt aat acc aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc	192
Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe	
50 55 60	
tct ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca	240
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	
65 70 75 80	
cag act gag gat gag gcg ata tat ttc tgt gct ctt tgg tac aac acc	288
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr	
85 90 95	
cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aga ctg act gtc cta ggc	330
His Leu Val Phe Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly	
100 105 110	

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide of H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 5

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
1 5 10 15	

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val	
35 40 45	

Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys	
50 55 60	

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu	
65 70 75 80	

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	

Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
100 105 110	

Ser Ala

5/28

<210> 6
<211> 110
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Polypeptide of L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 6
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 7
<211> 118
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Polypeptide of H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 7
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30
Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45
Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu
50 55 60

6/28

Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide of L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 8

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr
85 90 95His Leu Val Phe Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 1 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 9

7/28

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Peptide of CDR 2 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 10
Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Peptide of CDR 3 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 11
Ala Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Peptide of CDR 1 in L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 12
Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu Asn Tyr
1 5

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Peptide of CDR 3 in L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 13
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Leu

8/28

1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Peptide of CDR 1 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 14
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Peptide of CDR 2 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 15
Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn
1 5

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Peptide of CDR 3 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 16
Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr
1 5 10

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Peptide of CDR 1 in L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 17
Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Peptide of CDR 3 in L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 18
Ala Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val
1 5

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 19
ggaaattcat grasttskgg ytmarctkgr ttt 33

<210> 20
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 20
actagtcgac atggrcagrc ttacwtyytc attcct 36

<210> 21
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 21
actagtcgac atgatggtgt taagtcttct gtacct 36

<210> 22
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10/28

<220>

<223> Primer

<400> 22

actagtcgac atggatgg a gcttatcat s ytctt

36

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified base

<222> (30)..(30)

<223> i

<400> 23

cccaagcttc cagggrccar kggataracn grtgg

35

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

gggaattcat ggcctggayt ycwctywtmy tct

33

<210> 25

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified base

<222> (24)..(24)

<223> i

<400> 25

cccaagctta gctcytcwgw gganggyggr aa

32

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

taatacgact cactataggg

20

<210> 27
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Linker

<400> 27
ggaggaggcg gttcaggcg aggtggctct ggccgtggcg gatcc 45

<210> 28
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 28
gaccatggaa gtgaagctgg tggagtccgg ggg 33

<210> 29
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 29
cctccggaag agacagtgac cagggtaacct tggc 34

<210> 30
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 30
gcggatccca ggctgttgtg actcaggaat ct 32

<210> 31
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

12/28

<400> 31
gagcggccgc gcctaggaca gtcagttgg t 31

<210> 32
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 32
ggtaccctgg tcactgtctc ttccggagga ggccgttcag 40

<210> 33
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 33
agattcctga gtcacaacag cctgggatcc gccaccgcca g 41

<210> 34
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 34
gaccatggcc caggctttg tgactcagga atct 34

<210> 35
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 35
cctccggagc ctaggacagt cagttgggtt cctcc 35

<210> 36
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

13/28

<223> Primer

<400> 36

gcggatccga agtgaagctg gtggagtccg ggggagg

37

<210> 37

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

gagcggccgc tgcagagaca gtgaccagag t

31

<210> 38

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 38

accaaactga ctgtcctagg ctccggagga ggccggttcag

40

<210> 39

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 39

cccggaactcc accagcttca cttcggatcc gccaccgcca g

41

<210> 40

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

gaccatggat gtacagcttc aggagtcaagg acc

33

<210> 41

<211> 28

<212> DNA

14/28

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 41

cctggaaact gccgaatcca gttccagt

28

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 42

actggaactg gattcggcag tttccagg

28

<210> 43

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

cctccggagg agactgtgag agtggtaacct tggc

34

<210> 44

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

gcggatccca ggctgttgcg actcaggaat ct

32

<210> 45

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 45

gagcggccgc gcctaggaca gtcagtctgg t

31

<210> 46

15/28

<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 46
ggttaccactc tcacagtctc ctccggagga ggcgggttcag 40

<210> 47
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 47
agattcctga gtcacaacag cctgggatcc gccaccggcca g 41

<210> 48
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 48
gaccatggcc caggctgttg tgactcagga atct 34

<210> 49
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 49
cctccggagc ctaggacagt cagtctgggt cctcc 35

<210> 50
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 50
gcggatccga tgtacagctt caggagtcag gacctgg 37

<210> 51
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 51
cctggaaact gccgaatcca gttccagt

28

<210> 52
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 52
actggaaactg gattcggcag tttccagg

28

<210> 53
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 53
gagcggccgc tgaggagact gtgagagtgg t

31

<210> 54
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 54
accagactga ctgtcctagg ctccggagga ggcggttcag

40

<210> 55
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 55

17/28

tcctgactcc tgaagctgta catcgatcc gccaccgcca g	41
<210> 56	
<211> 717	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220>	
<223> scFv fragment Dx3860HL	
<400> 56	
gaa gtg aag ctg gtg gag tcc ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg	48
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt tcc tat	96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg gag tgg gtc	144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca tcc ttt agt aat ggt ggt atc acc tac tat cca gac agt gtg aag	192
Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys	
50 55 60	
ggc cga ttc acc atc tcc aga gat aat gcc agg aac atc ctg tac ctg	240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu	
65 70 75 80	
caa atg acc agt ctg agg tct gag gac acg gcc att tat tac tgt gca	288
Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
aga ggc tat ggt cct gct tac tgg ggc caa ggt acc ctg gtc act gtc	336
Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
100 105 110	
tct tcc gga gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga	384
Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
115 120 125	
tcc cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt	432
Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly	
130 135 140	
gaa aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act	480
Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr	
145 150 155 160	
ctt aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act	528
Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr	

18/28

165

170

175

ggt cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga 576
 Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
 180 185 190

ttc tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg 624
 Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly
 195 200 205

gca cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc 672
 Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser
 210 215 220

aac cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc 717
 Asn His Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230 235

<210> 57

<211> 720

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> scFv fragment Dx3860LH

<400> 57

cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa 48
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act ctt 96
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu
 20 25 30

aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt 144
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc 192
 Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca 240
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc aac 288
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc tcc gga 336
 His Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly

19/28

100	105	110	
gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc gaa gtg 384 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val 115 120 125			
aag ctg gtg gag tcc ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg tcc ctg 432 Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu 130 135 140			
aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt tcc tat gcc atg 480 Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met 145 150 155 160			
tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg gag tgg gtc gca tcc 528 Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser 165 170 175			
ttt agt aat ggt ggt atc acc tac tat cca gac agt gtg aag ggc cga 576 Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg 180 185 190			
ttc acc atc tcc aga gat aat gcc agg aac atc ctg tac ctg caa atg 624 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu Gln Met 195 200 205			
acc agt ctg agg tct gag gac acg gcc att tat tac tgt gca aga ggc 672 Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly 210 215 220			
tat ggt cct gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 720 Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 225 230 235 240			
<210> 58 <211> 729 <212> DNA <213> Unknown <220> <223> scFv fragment Dx3150HL			
<400> 58 gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct cag 48 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln 1 5 10 15			
tct ctg tct ctc acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt ggc 96 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly 20 25 30			
ttt tac tgg aac tgg att cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gaa tgg 144 Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp			

20/28

35	40	45		
atg ggc tac ata agc tac gac ggt tac aat aat tac aac cca ttt ctc Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu 50	55	60	192	
aaa aat cga gtg tcc atc act cgt gac aca tct gag aac cag ttt ttc Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe 65	70	75	80	240
ctg aag ttg cat tct gtg act act gag gac aca gct aca tat tac tgt Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys 85	90	95	288	
gta agt tac ggt agt cgg agg gga gtt acc tac tgg ggc caa ggt acc Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100	105	110	336	
act ctc aca gtc tcc tcc gga gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser 115	120	125	384	
ggc ggt ggc gga tcc cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr 130	135	140	432	
aca tca cct ggt gaa aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly 145	150	155	160	480
gct gtt aca act agt aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp 165	170	175	528	
cat tta ttc act ggt cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly 180	185	190	576	
gtt cct gcc aga ttc tct ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu 195	200	205	624	
acc atc aca ggg gca cag act gag gat gag gcg ata tat ttc tgt gct Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala 210	215	220	672	
ctt tgg tac aac acc cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aga ctg act Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe Gly Gly Thr Arg Leu Thr 225	230	235	240	720
gtc cta ggc Val Leu Gly				729

<210> 59
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220>
 <223> scFv fragment Dx3150LH

<400> 59 48
 cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act agt 96
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt 144
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc 192
 Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

tct ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca 240
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

cag act gag gat gag gcg ata tat ttc tgt gct ctt tgg tac aac acc 288
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr
 85 90 95

cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aga ctg act gtc cta ggc tcc gga 336
 His Leu Val Phe Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly
 100 105 110

gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc gat gta 384
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Val
 115 120 125

cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct cag tct ctg 432
 Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu
 130 135 140

tct ctc acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt ggc ttt tac 480
 Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr
 145 150 155 160

tgg aac tgg att cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gaa tgg atg ggc 528
 Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly
 165 170 175

22/28

tac ata agc tac gac ggt tac aat aat tac aac cca ttt ctc aaa aat	576
Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Asn	
180 185 190	
cga gtg tcc atc act cgt gac aca tct gag aac cag ttt ttc ctg aag	624
Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe Leu Lys	
195 200 205	
ttg cat tct gtg act act gag gac aca gct aca tat tac tgt gta agt	672
Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ser	
210 215 220	
tac ggt agt cgg agg gga gtt acc tac tgg ggc caa ggc acc act ctc	720
Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu	
225 230 235 240	
aca gtc tcc tca	732
Thr Val Ser Ser	

<210> 60				
<211> 239				
<212> PRT				
<213> Unknown				
<220>				
<223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3860HL				
<400> 60				
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly				
1 5 10 15				
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr				
20 25 30				
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val				
35 40 45				
Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys				
50 55 60				
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu				
65 70 75 80				
Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala				
85 90 95				
Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val				
100 105 110				
Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly				
115 120 125				
Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly				

23/28

130

135

140

Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
 145 150 155 160

Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr
 165 170 175

Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
 180 185 190

Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly
 195 200 205

Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser
 210 215 220

Asn His Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230 235

<210> 61

<211> 240

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3860LH

<400> 61

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

His Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Glu Val
 115 120 125

24/28

Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu
 130 135 140

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
 145 150 155 160

Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser
 165 170 175

Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg
 180 185 190

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu Gln Met
 195 200 205

Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
 210 215 220

Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 225 230 235 240

<210> 62

<211> 243

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3150HL

<400> 62

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

25/28

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr
 130 135 140
 Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly
 145 150 155 160
 Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp
 165 170 175
 His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly
 180 185 190
 Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu
 195 200 205
 Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala
 210 215 220
 Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe Gly Gly Thr Arg Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Leu Gly

<210> 63
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3150LH
 <400> 63
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr
 85 90 95
 His Leu Val Phe Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly
 100 105 110

26/28

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val
 115 120 125

Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr
 145 150 155 160

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly
 165 170 175

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Asn
 180 185 190

Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe Leu Lys
 195 200 205

Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ser
 210 215 220

Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

<210> 64

<211> 114

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide of V_H-chain variant (HL-M#5) of
 monoclonal antibody Dx 3860

<400> 64

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

27/28

85

90

95

Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 65

<211> 114

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide of V_H-chain variant (LH-M#1) of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 65

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Leu Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

<210> 66

<211> 114

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide of V_H-chain variant (LH-M#2) of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 66

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

28/28

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Val Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

<210> 67
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Polypeptide of V_H-chain variant (LH-M#3) of
 monoclonal antibody Dx 3860

<400> 67
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Leu Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Val Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004355

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/44, C12N15/13, C12N1/21, C12N1/19, C12N1/15, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/44, C12N15/13, C12N1/21, C12N1/19, C12N1/15, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-119279 A (Zaidan Hojin Shokuhin Yakuhin Anzen Center), 23 April, 2002 (23.04.02), (Family: none)	1-10
X	STANKER, L.H. et al., Monoclonal antibodies for dioxin: antibody characterization and assay development. Toxicology 1987, Vol.45, No.3, pages 229 to 243	1-10
X	Naoya OMURA et al, "Dioxin-rui no Jinsoku Kan'i Sokutei Men'eki Sokutei(Immunoassay)-ho, Environmental Management, 10 March, 2003 (10.03.03), Vol.39, No.3, pages 251 to 256	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 June, 2004 (08.06.04)Date of mailing of the international search report
22 June, 2004 (22.06.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C07K 16/44, C12N 15/13, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12N 5/10, C12P 21/08,
G01N 33/53, G01N 33/577

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C07K 16/44, C12N 15/13, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12N 5/10, C12P 21/08,
G01N 33/53, G01N 33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

REGISTRY (STN), CA (STN), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-119279 A (財団法人食品薬品安全センター) 2002. 04. 23 (ファミリーなし)	1-10
X	STANKER, L. H. et al. Monoclonal antibodies for dioxin: antibody characterization and assay development. Toxicology 1987, Vol. 45, No. 3, p. 229-243	1-10
X	大村 直也 他, ダイオキシン類の迅速・簡易測定 免疫測定 (イム ノアッセイ) 法 環境管理 2003. Mar. 10, Vol. 39, No. 3, p. 251-256	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 06. 2004

国際調査報告の発送日

22. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

高堀 栄二

4 B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448